

BEST AVAILABLE COPY



(19) RU (11) 2 228 953 (13) C2
(51) Int. Cl.⁷ C 12 N 1/20, C 02 F 3/34, B
09 C 1/10//C 12 N 1/20, C 12 R
1:38)

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 2002122613/13, 23.08.2002

(24) Effective date for property rights: 23.08.2002

(46) Date of publication: 20.05.2004

(98) Mail address:
142253, Moskovskaja obl., Serpukhovskij r-n,
p/o Dashkovka, ul. Lenina, 102A, NITs TBP

(72) Inventor: Marchenko A.I. (RU),
Vorob'ev A.V. (RU), Djadishchev N.R.
(RU), Rybalkin S.P. (RU), Blokhin V.A.
(RU), Marchenko S.A. (RU)

(73) Proprietor:
Nauchno-issledovatel'skij tsentr
toksikologii i gigienicheskoi reglamentatsii
biopreparatov (RU),

(54) STRAIN OF BACTERIUM PSEUDOMONAS ALCALIGENES MEV USED FOR TREATMENT OF SOIL,
GROUND AND SURFACE WATER FROM PETROLEUM AND PRODUCTS OF ITS PROCESSING

(57) Abstract:

FIELD: industrial microbiology, ecology.
SUBSTANCE: strain of bacterium *Pseudomonas alcaligenes* MEV is isolated from wheat rhizosphere and deposited in All-Russian collection of industrial microorganisms, Moscow, at number B-8278. The strain utilizes petroleum, mazut, diesel fuel, polycyclic aromatic hydrocarbons comprising from 2 to 4 benzene rings: naphthalene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, phenol. The strain is resistant to heavy

metal ions: Pb, Zn, Mo, Fe, Cr. The culture *Pseudomonas alcaligenes* MEV produces biological surface-active substances (biosurfactants). The strain can be used for preparing preparation for treatment of soils, ground and surface waters from petroleum, products of its processing and also in the combined pollution with petroleum hydrocarbons and metals. EFFECT: valuable properties of microorganism. 10 tbl, 11 ex

RU 2 2 2 8 9 5 3 C 2

R U
2 2 2 8 9 5 3
C 2



(19) RU (11) 2 228 953 (13) C2

(51) МПК⁷ C 12 N 1/20, C 02 F 3/34, B 09
C 1/10//(C 12 N 1/20, C 12 R 1:38)РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 2002122613/13, 23.08.2002

(24) Дата начала действия патента: 23.08.2002

(46) Дата публикации: 20.05.2004

(56) Ссылки: RU 2134723 С1, 20.08.1999. RU 2133770 С1, 27.07.1999. ЕР 1132462 А, 12.09.2001. US 5656169 А, 12.08.1997. WO 0056668 А1, 28.09.2000.

(98) Адрес для переписки:
142253, Московская обл., Серпуховский р-н,
п/о Дашковка, ул. Ленина, 102А, НИЦ ТБП(72) Изобретатель: Марченко А.И. (RU),
Воробьев А.В. (RU); Дядищев Н.Р.
(RU), Рыбалькин С.П. (RU), Блохин В.А.
(RU), Марченко С.А. (RU)(73) Патентообладатель:
Научно-исследовательский центр токсикологии
и гигиенической регламентации биопрепаратов
(RU)(54) ШТАММ БАКТЕРИИ PSEUDOMONAS ALCALIGENES MEV, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ОЧИСТКИ ПОЧВ,
ГРУНТОВЫХ И ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД ОТ НЕФТИ И ПРОДУКТОВ ЕЕ ПЕРЕРАБОТКИ

(57)

Штамм бактерий *Pseudomonas alcaligenes* MEV выделен из ризосфера пшеницы, депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, г.Москва под номером В-8278. Штамм утилизирует нефть, мазут, дизельное топливо; полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), содержащие от 2 до 4 бензольных колец; нафталин, фенантрен, антрацен, флуорантен; фенол. Он устойчив кионам тяжелых металлов: Pb, Zn, Mo, Fe, Cr. Культура *Pseudomonas alcaligenes* MEV продуцирует биологические поверхности-активные вещества (биосурфактанты). Штамм может быть использован для получения препарата для очистки почв, грунтовых и поверхностных вод от нефти, продуктов ее переработки, а также при комбинированном загрязнении углеводородами нефти и металлами. 10 табл.

RU

2 2 2 8 9 5 3
C 2

RU ? 2 2 8 9 5 3 C 2

BEST AVAILABLE COPY

R U ? 2 2 8 9 5 3 C 2

Изобретение относится к области микробиологии и представляет собой новый бактериальный штамм, который может быть использован для очистки почвы, грунтовых и поверхностных вод от нефти и продуктов ее переработки.

Загрязнение окружающей среды нефтью и продуктами ее переработки представляет серьезную угрозу здоровью населения и природе. Тяжелые фракции нефти, токсичные и наиболее трудно разлагаемые, содержат полилипидические ароматические углеводороды (ПАУ). ПАУ относятся к категории приоритетных загрязнителей окружающей среды.

Известны штаммы микроорганизмов: *Pseudomonas alcaligenes* E7 [1], *Thiobacillus lignorum* L-1 ГКМ ВИЗР N 103 [2], *Pseudomonas alcaligenes* B-1 [3], *Mycobacterium fluorescens* EX-91 [4], *Rhodococcus species* 56Д [5], *Pseudomonas putida* 9 [6], *Rhodococcus species* MFN [7], которые могут разлагать углеводороды нефти, в том числе и ПАУ в почве и воде. Недостатком вышеперечисленных штаммов является то, что они осуществляют деструкцию полилипидических ароматических углеводородов, содержащих только 2 и 3 бензольных кольца.

Наиболее близким к предлагаемому изобретению является штамм бактерий *Pseudomonas alcaligenes* E7 [1], обладающий высокими характеристиками по биодеградации нефти и нефтепродуктов. Однако недостатком этого штамма является то, что из полилипидических ароматических углеводородов он утилизирует только нафталин при температуре 20-30°C.

Цель изобретения состоит в получении нового штамма микроорганизмов, быстро и эффективно утилизирующего *in situ* в почвах, грунтовых и поверхностных водах нефть и продукты ее переработки при комбинированном загрязнении солями тяжелых металлов, а также продуцирующего внешнепочечные биологические поверхности активные вещества (биосурфактанты), которые ускоряют биодеградацию малозаводимых гидрофобных ПАУ.

Предлагаемый штамм *Pseudomonas alcaligenes* MEV выделен из ризосферы пшеницы и селекционирован путем пересевов отдельных колоний бактерий на чашках с минимальным агаром А [8], который содержит (г/дм³): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ - 6,0; KH_2PO_4 - 3,0; NaCl - 0,5; NH_4Cl - 1,0; $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,01; агар-агар - 15,0; вода дистиллированная - до 1 л дм³; pH - 7,2; в присутствии фенантрена в количестве 300 мг на 1 дм³ питательной среды.

Штамм *Pseudomonas alcaligenes* MEV идентифицирован в соответствии с определителем Берга [9] и депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) под номером ВКПМ В-8278.

Предлагаемый штамм характеризуется следующими морфологическими и физиологико-биохимическими признаками. Грамотрицательные подвижные палочки размером 2-3 × 0,6-0,8 мкм, спор не образует. На агаризованной питательной среде из кислотного гидролизата рыбной муки на вторые сутки образуются плоские матовые

колонии диаметром 2-3 мм. В бульоне из кислотного гидролизата рыбной муки растет в виде пленки и равномерного помутнения.

Штамм является аэробом, обладает оксидазной и каталазной активностью, растет в температурном диапазоне от 8 до 41°C, оптимум 26°C. В качестве источника углерода потребляет ацетат, цитрат, сукцинат, аланин, аргинин. Обладает аргинидигидролазной активностью, восстанавливает нитраты, денитрификационная активность отсутствует. Прототроф, в дополнительных факторах роста не нуждается. Гидролизует желатин, обладает лизиназной и уреазной активностью. Не гидролизует крахмал и полу-β-оксибутират.

Штамм непатогенен (невирулентен, нетоксичен, токсигенность не обладает). На штамме оформлено заключение о безопасности.

Генетические особенности. Культура устойчива к пенициллину 50 мкг/дм³, канамицину - 50 мкг/дм³. Штамм устойчив к ионам тяжелых металлов: Pb, Zn, Mo, Fe - 120 мг/дм³, Cr - 600 мкг/дм³.

Культура использует в качестве единственного источника углерода нефть, нефтепродукты, полилипидные ароматические углеводороды, содержащие 2, 3 и 4 бензольных кольца (нафталин, фенантрен, антрацен, флуорантен), а также фенол (таблица 3).

Штамм продуцирует биологические поверхности-активные вещества (биосурфактанты). Штамм хорошо растет на богатых питательных средах на основе мясопептонного бульона (МПБ) и ферментативного гидролизата рыбной муки (ФГРМ).

Условия хранения: в лиофилизированном состоянии при 4 °C - 3 года; на агаризованном ферментативном гидролизате рыбной муки при 4°C две недели, в пробирках на склоненном агаре под стерильным вазелиновым маслом при 4° - до года. Штамм может поддерживаться регулярными пересевами (1 раз в 2 недели) на агаризованном ферментативном гидролизате рыбной муки с 300 мг/дм³ фенантрена.

Изложение поясняется следующими примерами.

Пример 1. Штамм бактерий *Pseudomonas alcaligenes* MEV выращивают аэробно в жидкой среде на ферментативном гидролизате рыбной муки с 200 мг/л фенантрена на качалке при 200 об/мин и температуре 26±2°C в течение 18 часов. Титр выросшей культуры составляет $2,0 \times 10^9$ колоний образующих единиц (КОЕ) на 1 см питательной среды.

Пример 2. Штамм *Pseudomonas alcaligenes* MEV выращивают на синтетической среде следующего состава, г/дм³: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ - 0,5; KH_2PO_4 - 0,7; NaCl - 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,8; дистиллированная вода - до 1 дм³; pH 7,2. Нефть, мазут, дизельное топливо добавляют в питательную среду в количестве 1% от массы питательной среды в качестве единственного источника углерода. Опыт проводят в четырех повторностях. В колбы объемом 100 см³ вносят по 30 см³ минеральной среды и по 300 мг нефти, мазута и дизельного

BEST AVAILABLE COPY

топлива. Колбы засевают клетками штамма *Pseudomonas alcaligenes* MEV до концентрации $1 \cdot 10^7$ КОЕ/см³. В качестве контролей используют незасеянные колбы со средой, а также с нефтью и нефтепродуктами. Колбы культивируют на качалке при 200 об/мин и 30°C в течение 14 суток. Эффективность биодеградации определяют на газо-жидкостном хроматографе. Результаты эксперимента представлены в таблице 1. Полученные результаты показывают, что в течение 5 суток при 30°C штамм MEV утилизирует нефть, мазут и дизельное на %: 72,0, 53,4, 94,3 соответственно.

Таблица 1
Биодеградация нефти в продуктах от переработки при температуре 30°C в течение 5 суток, % (дата)

Вариант	Биодеградация
Нефть	72,0±4,5
Мазут М-40	53,4±4,6
Дизельное топливо	94,3±1,1

Примечание: № - среднее четырех повторностей; ± - вариационный интервал с вероятностью 95%.

Пример 3. Предлагаемый штамм культивируют также как в примере 2. Однако культивирование проводят при 20 °C. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2
Биодеградация нефти в продуктах от переработки при температуре 20°C в течение 5 суток, % (дата)

Вариант	Биодеградация
Нефть	68,0±4,3
Мазут М-40	41,4±4,2
Дизельное топливо	61,3±4,5

Примечание: № - среднее четырех повторностей; ± - вариационный интервал с вероятностью 95%.

Пример 4. В колбы на 100 см³ вносят по 30 см³ минеральной среды (состав среды указан в примере 2) и по 200 мг нафталина, фенантрена, антрацена, флуорантена, фенола. Колбы засевают культурой *Pseudomonas alcaligenes* MEV до концентрации $1 \cdot 10^7$ КОЕ/см³. В качестве контролей используют незасеянные колбы со средой, а также с изучаемыми веществами. Культивирование проводят на качалке при 200 об/мин, температуре 20°C в течение 5 суток. Эффективность биодеградации определяют на газо-жидкостном хроматографе. Результаты экспериментов показывают, что за 5 дней биодеградация нафталина и фенантрена прошла на 100%, а антрацена, флуорантена и фенола на %: 42,4; 62,1 и 46,3 соответственно (таблица 3).

Таблица 3
Биодеградация поликлинических углеводородов в фракциях извлечения Родственник MEV при 20°C в течение 5 суток, % (дата)

Извлечение	Чистое количество углеводородов в фракции	Биодеградация
Нафталин	2	62,4±5,6
Фенантрен	3	76,3±5,8
Антрацен	3	42,4±4,8
Флуорантен	4	62,1±3,2
Фенол	1	46,3±4,3

Примечание: № - среднее четырех повторностей; ± - вариационный интервал с вероятностью 95%.

Пример 5. В колбы на 100 см³ вносят по 30 см³ синтетической среды (состав среды указан в примере 2), 300 мг нефти, 15 мг/дм³ солей Pb, Zn, Mo, Fe и Cr 50 мкг/дм³ и клетки штамма *Pseudomonas alcaligenes* MEV до концентрации

$1 \cdot 10^7$ КОЕ/см³. Контролем служит засеянная колба с нефтью. Исследуемые колбы культивируют в четырех повторностях на качалке при 28°C и 200 об/мин в течение 5 дней. Результаты эксперимента показывают, что эффективность деградации нефти предstawляемым штаммом в вариантах с солями металлов и без них не отличается (таблица 4).

Таблица 4
Биодеградация нефти в присутствии гомогенного комплекса солей металлов родственника MEV, % (дата)

Вариант	Биодеградация	
	С контролем	Без металлов
Нефть	72,0±3,3	72,0±3,3

Примечание: № - среднее четырех повторностей; ± - вариационный интервал с вероятностью 95%.

Пример 6. Культуральную жидкость штамма *Pseudomonas alcaligenes* MEV, выращенного как в примере 1, отделяют от микробных клеток центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 минут. В качестве биосурфактансодержащей жидкости в опыте используется культуральная жидкость разведенная дистиллированной водой в 10 раз. Поверхностное натяжение этой жидкости определяют с использованием кольцевого тензиометра. Контролем служит дистиллированная вода. Результаты определения поверхностного натяжения показывают (таблица 5), что давление культуральной среды в дистиллированную воду приводит к снижению поверхностного натяжения дистиллированной воды с 68,8 дин/см до 31,2 дин/см. Добавление питательной среды в таком же соотношении 1:10 не оказывает влияния на поверхностное натяжение дистиллированной воды. Таким образом, культуральная жидкость предлагаемого штамма содержит биологические поверхностно-активные вещества.

Таблица 5
Задачи фенольфталево-индикаторной жидкости штамма Родственник MEV в присутствии добавленной питательной среды, дин/см (дата)

Насыщенная среда	Поверхностное натяжение
Дистиллированная вода	68,8±2,1
Биосурфактансодержащая жидкость	31,2±2,6
Дистиллированная вода + питательная среда	34,3±2,9

Примечание: № - среднее четырех повторностей; ± - вариационный интервал с вероятностью 95%.

Пример 7. В колбы на 100 см³ вносят по 27 см³ синтетической среды среды и смесь, содержащую 200 мг нафталина, фенантрена, антрацена, флуорантена. В колбы добавляют, по 3 см³ биосурфактансодержащей культуральной среды как в примере 6. Колбы засевают культурой *Pseudomonas alcaligenes* MEV до концентрации $1 \cdot 10^7$ КОЕ/см³. В качестве контролей используют колбы со смесью нафталина, фенантрена, антрацена и флуорантена. Культивирование проводят на качалке при 200 об/мин, температуре 20°C в течение 5 суток. Эффективность биодеградации полициклических ароматических углеводородов определяют на газо-жидкостном хроматографе. Результаты эксперимента показывают (таблица 6), что добавление биосурфактанта повышает эффективность биодеградации ПАУ. Так, за 5 суток в вариантах опыта с добавлением биосурфактанта биодеградация нафталина и фенантрена прошла на 100%, а антрацена и флуорантена на %: 71%; 83% соответственно.

R U
2 2 2 8 9 5 3 C 2

BEST AVAILABLE COPY

RU 2228953C2

Пример 8. В экскаторы объемом 3 дм³ с 2 кг дерново-подзолистой почвы вносят 1% по массе нефти, мазута, дизельного топлива и тщательно перемешивают.

Суспензию бактерий штамма *Pseudomonas alcaligenes* MEV разводят фосфатным буферным раствором pH 7,2 и вносят в почву, загрязненную ксенобиотиками из расчета 1.10⁷ КОЕ на 1 г почвы. Почву тщательно перемешивают, увлажняют до 60% от общей влагоемкости и экспонируют при 20°C в течение 2 месяцев. Для анализа образцы почвы отбирают в момент начала эксперимента и через 2 месяца. Эффективность биодеградации нефти и продуктов ее переработки предлагаемым штаммом в почве оценивают методом газожидкостной хроматографии. Результаты исследований показывают, что предлагаемый штамм в течение 2 месяцев при температуре 20°C осуществляет деградацию 74% нефти, 63% мазута и 100% дизельного топлива.

Таблица 7 Биодеградация нефти и продуктов ее переработки в почве при температуре 20°C предложенным штаммом MEV в течение 2 месяцев, % (дата)		
Вещество	Биодеградация	
Нефть	74,0±4,1	
Мазут М-40	53,0±4,8	
Дизельное топливо	87,3±7,1	

Примечание: М- среднее четырех повторений; д - стандартный интервал с коэффициентом 95%.

Пример 9. Предлагаемый штамм вносят в почву так же как в примере 8. Однако эксперимент проводят при 30°C. Результаты представлены в таблице 8.

Таблица 8 Биодеградация нефти и продуктов ее переработки в почве при температуре 30°C предложенным штаммом MEV в течение 2 месяцев, % (дата)		
Вещество	Биодеградация	
Нефть	72,0±8,1	
Мазут М-40	53,4±4,4	
Дизельное топливо	97,3±7,1	

Примечание: М- среднее четырех повторений; д - стандартный интервал с коэффициентом 95%.

Пример 10. В экскаторы объемом 3 дм с 2 кг дерново-подзолистой почвы вносят 1% по массе смеси нафталина (4 г), фенантрена (4 г), антрацена (4 г), флуорантена (4 г), фенола (4 г) и тщательно перемешивают. Суспензию бактерий штамма *Pseudomonas alcaligenes* MEV полученную как в примере 1 разводят фосфатным буферным раствором с pH 7,2 до титра 1.10⁶ КОЕ/см³ и вносят в почву, загрязненную ксенобиотиками из расчета 1.10⁷ КОЕ на 1 г почвы. Почву тщательно перемешивают, увлажняют до 60% от общей влагоемкости и экспонируют при 20°C в течение 2 месяцев. Для анализа образцы почвы отбирают в начале эксперимента и через 2 месяца. Эффективность биодеградации нефти и продуктов ее переработки предлагаемым штаммом в почве оценивают методом

газожидкостной хроматографии. Результаты исследований показывают, что предлагаемый штамм в течение 2 месяцев при температуре 20°C осуществляет деградацию 100% нафталина и фенантрена, 86% флуорантена, 46% антрацена и 63% фенола.

Таблица 9 Биодеградация нафталина и фенантрена в почве при температуре 20°C предложенным штаммом MEV в течение 2 месяцев, % (дата)		
Вещество	Число повторных замесов в месяце	Биодеградация
Нафталин	2	100
Фенантрен	3	100
Антрацен	3	86,4±3,4
Флуорантен	4	42,4±3,4
Фенол	1	63,3±6,3

Примечание: М- среднее четырех повторений; д - стандартный интервал с коэффициентом 95%.

Пример 11. В экскаторы объемом 3 дм с 2 кг дерново-подзолистой почвы вносят 20 г нефти и 15 мг/кг почвы солей Pb, Zn, Mo, Fe, Cr - 50 мкг/кг и клетки штамма *Pseudomonas alcaligenes* MEV до концентрации 1.10⁷ КОЕ/г почвы. Почву тщательно перемешивают, увлажняют до 60% от общей влагоемкости и экспонируют при 20°C в течение 2 месяцев. Для анализа образцы почвы отбирают в начале эксперимента и через 2 месяца. Эффективность биодеградации нефти предлагаемым штаммом в почве оценивают методом газожидкостной хроматографии. Контролем служит почва с нефтью и внесенными микроорганизмами. Повторность опыта четырехкратная. Результаты эксперимента показывают, что эффективность деградации нефти предлагаемым штаммом в вариантах с солями металлов и без них не отличается (таблица 10).

Таблица 10 Биодеградация нефти в почве с внесением солей металлов предложенным штаммом MEV, % (дата)		
Вещество	Биодеградация	
Нефть	72,0±3,3	72,0±6,1

Примечание: М- среднее четырех повторений; д - стандартный интервал с коэффициентом 95%.

Таким образом, преимуществом предлагаемого штамма является то, что он утилизирует при температуре 20 - 30°C нефть, мазут и дизельное топливо в почве и воде от 43,4% до 97,3%, а также поликарбоновые ароматические углеводороды, содержащие от 2 до 4 бензольных колец (нафталин, фенантрен, антрацен, флуорантен). Предлагаемый штамм производит биологические поверхностно-активные вещества, что ускоряет деградацию поликарбоновых углеводородов в водной среде. Устойчивость штамма к ионам тяжелых металлов расширяет диапазон его применения при очистке территорий от комбинированного загрязнения углеводородами нефти и металлами.

Список литературы
1. Патент России №2134723, кл. C 12 N 60/20. Штамм *Pseudomonas alcaligenes* E7, используемый для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов. - 1999.

2. Патент России №2157842, кл. C 12 N 60/26. Штамм *Trichoderma lignorum* L-1 ГКМ ВИЗР №103 для окисления углеводородов нефти и нефтепродуктов. - 2000.

3. Патент России №2133770, кл. C 12 N

BEST AVAILABLE COPY

1/20. Штамм *Pseudomonas alcaligenes* B-1, используемый для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов. - 1999.

4. Патент России №92005971, кл. C 12 N 1/20. Штамм *Mycobacterium flavescentis* EX-91, используемый для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов. - 1996.

5. Патент России №95119734, кл. C 12 N 1/20. Штамм *Rhodococcus species* 56D, используемый для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов. - 1998.

6. Патент России №2134722, кл. C 12 N 1/20. Штамм *Pseudomonas putida* 9, используемый для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов. - 1999.

7. Патент России №2133769, кл. C 12 N

1/20. Штамм *Rhodococcus species* MFN, используемый для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов. - 1998.

8. Дэвис Р., Бодстейн Д., Рот Дж. Методы генетической инженерии. Генетика бактерий. Пер. с англ. под редакцией чл. - корр. АН СССР Р.Б.Хесина. - М: Мир, 1984-176 с.

9. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Baltimore, Maryland: Williams&Wilkins, 1994. - 787 p.

10. **Формула изобретения:**
Сурфактантобразующий штамм бактерий *Pseudomonas alcaligenes* MEV денонирован в ВКПМ B-8278, используемый для очистки почв, грунтовых и поверхностных вод от нефти и продуктов ее переработки *in situ*.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

RU 2228953C2

R U 2 2 2 8 9 5 3 C 2